

Polyaminoacid-based particles for use as active principle vectors, and methods for preparing same**Publication number:** CN1183040 (A)**Publication date:** 1998-05-27**Inventor(s):** HUILLE S [FR]; LEMERCIER A [FR]; SOULA G [FR] +**Applicant(s):** FLAMEL TECH SA [FR] +**Classification:**

- international: A23L1/29; A61K8/04; A61K8/30; A61K8/64; A61K9/16; A61K9/51; A61K47/42; A61Q19/00; A23L1/29; A61K8/04; A61K8/30; A61K9/16; A61K9/51; A61K47/42; A61Q19/00; (IPC1-7): A61K9/16; A61K9/51

- European: A61K8/04H; A61K8/88; A61K9/16H6D; A61K9/51; A61Q19/00

Application number: CN19961093659 19960328**Priority number(s):** FR19950003978 19950328**Also published as:**

CN1148170 (C)

EP0734720 (A1)

EP0734720 (B1)

ZA9602446 (A)

US5904936 (A)

more >>

Abstract not available for CN 1183040 (A)

Abstract of corresponding document: **EP 0734720 (A1)**

Vector particles for the admin. of active agent(s) are based on polyamino acid(s) (PAA) and of average size >200 μm. Their PAA's comprise >= 2 types of recurrent amino acids NAA and IAA: NAA = hydrophobic neutral amino acid, and IAA = ionisable lateral chain amino acid; >= 1 part of the IAA type recurrent amino acids being in ionised form. The recurrent amino acids of each type may be the same or different and the mol.wt. of the PAA is >= 4000 Da (pref. >= 5000 Da).

.....
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 9/16

A61K 9/51



[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 96193659.2

[43]公开日 1998年5月27日

[11]公开号 CN 1183040A

[22]申请日 96.3.28

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 陈文平

[30]优先权

[32]95.3.28 [33]FR [31]95 / 03978

[86]国际申请 PCT / FR96 / 00460 96.3.28

[87]国际公布 WO96 / 29991 法 96.10.3

[85]进入国家阶段日期 97.10.31

[71]申请人 弗拉梅技术公司

地址 法国维尼希尤克斯

[72]发明人 S·胡尔 A·莱莫希尔
G·索拉

权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 用作活性成分载体的多聚氨基酸基颗粒
和其制备方法

[57]摘要

本发明涉及可用于活性成分 (AP) 给药、特别是通过口服或非肠胃途径给予药物或营养活性成分的输送载体。本发明解决的技术问题是提供了对活性成分惰性、粒度可控、坚固而不昂贵的由聚氨基酸基 (纳米) 或 (微米) 颗粒组成的输送载体。根据本发明，颗粒的平均粒度小于 200μm，由 Leu / Glu 型聚氨基酸组成，其中 Leu / Glu+Leu > 3%，Mw > 4000D。

权 利 要 求 书

1. 基于平均粒度小于 $200\mu\text{m}$ 的聚氨基酸的活性成分输送颗粒，其特征在于：

— 在于其构成性多聚氨基酸（PAA）含有至少两类重复氨基酸，AAN 和 AAI：

◆ AAN 型相当于疏水性中性氨基酸，

◆ AAI 型相当于带有可离子化侧链的氨基酸，AAI 型重复氨基酸的至少一部分为电离形式，

AAN 和 AAI 中每类重复氨基酸相同或不同，

— 还在于多聚氨基酸的重均摩尔质量 M_w 不低于 4000D，优选不低于 5000D。

2. 根据权利要求 1 的颗粒，其特征：

— 在于其组成性 PAA 是“嵌段” PAA 和/或“统计” PAA，

— 还在于：

◆ 对“嵌段” PAA：

· AAN/AAN+AAI 摩尔比 $\geq 6\%$ ，优选 $\geq 15\%$ ，

· $M_w \geq 5500D$ ，优选 $6500D \leq M_w \leq 200000D$ ，更优选

$8000D \leq M_w \leq 200000D$ ，

◆ 对“统计” PAA：

· AAN/AAN+AAI 摩尔比 $\geq 20\%$ ，优选 $\geq 25\%$ ，

· $M_w \geq 10000D$ ，优选 $20000D \leq M_w \leq 500000D$ ，更优选

$200000D \leq M_w \leq 150000D$ 。

3. 根据权利要求 1 或 2 的颗粒，其特征

— 在于 AAN 选自 Leu、Ile、Val、Ala、Pro、Phe 和其混合物，

— 还在于 AAI 由 Glu 和/或 Asp 组成。

4. 根据权利要求 1 的颗粒，其特征在于聚氨基酸的平均浓度在 0.01-25%（干重）之间，优选在 0.05-10%（干重）之间。

5. 根据权利要求 1 的颗粒，其特征在于它们是平均粒度为 0.01-

0.5μm，优选 0.03-0.4μm 的纳米输送颗粒（NDP）。

6. 根据权利要求 1 的颗粒，其特征在于它们是平均粒度大于 0.5μm，优选不超过 20μm 的微米输送颗粒（MDP）。

7. 根据权利要求 6 的颗粒，其特征在于它们是从权利要求 1 的颗粒获得的，还在于它们优选含有至少一种聚集剂。

8. 根据权利要求 1 的颗粒，其特征在于它们包含至少一种活性成分。

9. 能用作活性成分输送载体的聚氨基酸基颗粒的制备方法，其特征：

— 在于使用聚氨基酸（PAA）：

◆ 含有至少两类重复氨基酸，AAN 和 AAI：

— AAN 型相当于疏水中性氨基酸，

— AAI 型相当于具有可离子化侧链的氨基酸，

AAN 和 AAI 中每类重复氨基酸相同或不同，

◆ AAN/AI+AAN 摩尔比 $\geq 3\%$ ，优选 $\geq 5\%$ ，

◆ 聚氨基酸的重均摩尔质量不低于 4000D，优选不低于 5000D，

— 还在于这些聚氨基酸在液体、优选在盐水溶液中进行分散，液体 pH 调节在一个选定的值，此时至少部分 AAI 型氨基酸为电离形式，

— 还在于收集颗粒的胶体溶液。

10. 根据权利要求 9 的方法，其特征：

— 在于 AAN 选自 Leu、Ile、Val、Ala、Pro、Phe 和其混合物，

— 还在于 AAI 由 Glu 和/或 Asp 组成。

11. 根据权利要求 9 的方法，其特征在于优选在将聚氨基酸引入介质之前，将至少一种活性成分溶解在液体中，使得在引入聚氨基酸后能获得一种载活性成分的颗粒的胶体溶液。

12. 根据权利要求 9 的方法，其特征在于其包括至少一个用至少一种聚集剂聚集颗粒的附加步骤，所述聚集剂优选由盐和/或酸和/或碱和/或适当时为离子性的聚合物组成。

13. 根据权利要求 12 的方法，其特征在于选择聚合物的浓度不低于 $10^{-2}\%$ ，优选 0.05-30%，更优选 0.05-5% w/v。

14. 权利要求 1 的颗粒和/或由权利要求 9 的方法获得的颗粒，其特征

在于活性成分为优先选自下列物质的药物：

- ◆蛋白和/或肽，其中优选选自：血红蛋白，细胞色素，白蛋白，干扰素，抗原，抗体，calatomin，促红细胞生成素，胰岛素，生长激素，第IX因子，白细胞介素或其混合物，
- ◆多糖，尤其选择肝素，
- ◆核酸，优选RNA和/或DNA的寡核苷酸，
- ◆和它们的混合物。

15. 权利要求1的颗粒和/或由权利要求9的方法获得的颗粒，其特征在于活性成分由至少一种疫苗组成。

16. 权利要求1的颗粒和/或由权利要求9的方法获得的颗粒，其特征在于活性成分由至少一种植物保护剂或化妆产品组成。

17. 药物、营养品、植物保护剂或化妆品，其特征在于它含有权利要求1的和/或按权利要求9的方法获得的颗粒。

说 明 书

用作活性成分载体的多聚氨基酸

基颗粒和其制备方法

本发明的领域是可用于活性成分（AP）透过细胞膜给药的输送载体。这些输送载体使得活性成分在被保护下体内运送至其作用位点。活性成分优选是通过口、鼻、阴道、眼、皮下、静脉内、肌内、皮内、腹膜内、大脑内、肠胃外等途径给予动物或人体的药品或营养物，但也可以是用于处理农作物作为作物保护剂的除草剂、杀虫剂、杀昆虫剂、杀真菌剂等。所有这些应用中，活性成分输送载体旨在提高活性成分的生物利用度。这些输送载体例如可以是提供活性成分缓释的系统。

本发明特别涉及的活性成分例如为蛋白、糖蛋白、肽、多糖、脂多糖、寡核苷酸和多核苷酸，但不限于这些。

本发明更具体涉及基于多聚氨基酸用作活性成分（特别是药物活性成分）输送载体的颗粒，最好是亚微米级和/或微米级的颗粒。它们因而为输送颗粒（DP），其中，按本发明特有的命名法（如下文所定义）本说明书以下区分纳米输送颗粒（NDP）和微米输送颗粒（MDP）。

本发明涉及裸颗粒本身，以及由载有目标活性成分的颗粒组成的活性成分输送载体系统。

本发明还涉及所述颗粒的制备方法。

遗传工程和生物技术的进步，以及与其相关的遗传工具、蛋白和生物活性肽的发现，使得高选择性和内在活性的新药物活性成分不断涌现。但这些活性成分在到达其治疗作用位点之前在体内易于降解，其生物利用度因而很低。口服给药时，胃肠道构成活性成分的强大物理化学屏障，活性成分一方面必须耐受消化系统的降解，另一方面要通过胃肠表皮膜。关于这一点可参见 M. J. HUMPHREY 的综述（“肽药物的输送系统”， S. DAVIS 和 L. ILLUM 编， Plenum 出版社，纽约， 1986），其中提到了口服肽的低生物利用度。

当然，这些体内输送和定位的不利并不只限于蛋白，还涉及由能用于基因治疗技术的遗传工具（寡核苷酸、多核苷酸、质粒）组成的活性成分。

为了实现这一点，已有人提出将活性成分包入输送颗粒中。这些包囊技术的价值是为了提高活性成分的生物利用度，通过保证其不受体内损坏而保护和/或转运活性成分到达其治疗位点。

在所有可设想用于包囊活性成分的材料中，考虑到其内在特性现越来越多地使用聚合物。

对这种输送颗粒所希望达到的一系列要求是苛刻的，特别包括以下条件：

1. 应该可能、最好能够得到平均直径在一到几微米级且粒径分布窄的输送颗粒，以便能使输送颗粒的粒度适于所选的给药方法和/或预期的治疗位点。例如，如果要经口服途径进行粘膜免疫，输送颗粒的粒度应在 0.5~10 μm ，以便输送颗粒能进入派伊尔结并达到淋巴组织。皮下给药时，具有粒度大于 10 μm 的输送颗粒有利，以使这种颗粒不再进入大循环，迅速被网状内皮系统内化，但从其注射位点逐渐扩散。

这一条件涉及输送颗粒的大小控制，既要控制输送颗粒的粒度分布还要控制其平均直径，这从工艺角度看是很复杂的操作。

2. 希望输送颗粒对活性成分提供的保护直到释放位点。例如，疫苗组成的活性成分口服给药时，疫苗在整个胃肠道中受到保护。

3. 构成输送颗粒的聚合物最好是生物相容性和可生物降解的，还希望它能被代谢为对身体无毒的物质。

4. 构成输送颗粒的聚合物最好不诱发免疫应答（不具有免疫原性）。

5. 最后，还希望能通过不使活性成分变性的方法获得输送颗粒，因此不能使用有机溶剂和/或高温。

有大量的现有技术徒劳地试图满足这些所有条件，但其所用途径仅部分满足了上述要求。

这些不成功的提议方案中，可提及专利 US - A - 5286495，它涉及在水相中用由藻酸盐和聚赖氨酸组成的材料包囊蛋白的方法。考虑到该方法没有使用有机溶剂、破坏性化学试剂或高温，它对含蛋白的活性成分是

非致变性的。但所用的输送颗粒制备技术（蒸发）不能使颗粒小于 $35\mu\text{m}$ ，它们从而不能被身体细胞内在化。

另外，乳液技术一般用于制备几微米大小的微粒。

例如，专利申请 WO 91/06286 和 WO 91/06287 描述了在乳液中形成颗粒的方法，其中：

- 选自胶原、酪蛋白、角蛋白和优选的谷醇溶蛋白的疏水蛋白，
- 或生物相容性和生物可降解的聚合物，如聚乳酸或聚原酸酯，用作聚合物。

活性成分可是疏水性的或亲水性的，但对后者推荐用双乳液技术。微粒的大小为约 $100\mu\text{m}$ ，优选为 50nm 到 $100\mu\text{m}$ 。

专利申请 WO 89/08449 也涉及乳液包囊法，以将活性成分引入小于 $100\mu\text{m}$ 的聚乳酸微粒中。该文献特地提及这一大小是通过粘膜的淋巴组织吸收的最大限（口服、鼻内、直肠内和眼科给药）。

乳液技术在理论上是很吸引人的，因为它能使大部分活性成分用于微粒中，其粒径可控制在 $1\mu\text{m}$ 的水平。但在这些技术中使用了有机溶剂，以溶解构成颗粒的聚合物。这些溶剂为例如酮、醇、酰胺或其混合物。不幸的是证明这些溶剂可以是致变性的，特别是对肽或多肽活性成分。

还已知在不太高的温度下水溶液中形成的生物相性输送颗粒，称为类蛋白。这些输送颗粒从 1970 年以来被 W. FOX 和 K. DOSE 所描述，“分子演变和生命起源”，Marcel DEKKER 公司出版(1977)。

在此工作的基础上，专利申请 WO 88/01213 提出了一种基于类蛋白的活性成分输送系统。所用聚合物是合成的或天然氨基酸和/或小肽链经热缩合获得的人工多肽的混合物。所选的缩合方式导致支链寡聚物，因而它仅微溶于水。然后对这些支链寡聚物进行过滤筛选以获得水溶性成分。这一成分必然由很小分子量的支链交联产物组成。该发明的微粒是通过改变 pH 而得到的，pH 改变使支链寡聚物作为类蛋白沉淀出来。

当发生沉淀的溶液中含有活性成分时，它们的一部分在类蛋白形成过程中被带入其中。

这一系统的缺点是：

- 包囊率低，
- 纯化方法复杂，
- 由于合成方法的原因使氨基酸的连接不规则（非 α - 肽），这使得不能断言其酶降解反应与 α - 多聚氨基酸的相同，
- 最后，使用大量不同氨基酸单体，这可能诱导免疫应答。

专利申请 WO 93/25589 涉及氨基酸热缩合合成类蛋白的改进方法。

此例中的类蛋白也是从低分子量支链寡聚物形成的，氨基酸连接不规则。这些支链寡聚物的水溶性特征是这样达到的：

- 一方面使用很低的分子量（250 - 2400），相当于2 - 20个氨基酸的很短连接，
- 另一方面选择起始氨基酸。

如前述，降低水溶性支链寡聚物的 pH，引发沉淀而形成类蛋白。当沉淀发生时存在水溶性活性成分，则在类蛋白形成过程中一部分活性成分被带入其中。包囊率仍不高：20 - 40%。另外，降低 pH 可能对某些活性成分有害。

另外，必须在一特异 pH 下进行包囊这一事实，构成一种麻烦的工艺限制，将这些微粒的应用限制在类蛋白沉淀的 pH 下，而这必然与生理 pH 不符。例如，在胃肠道中 pH 变化在 2 - 7.5 之间。

还要提及美国专利 4351337，它与本发明涉及的活性成分输送属于不同的领域。该专利公开了置于体内相当固定位置中的固定化植入物。因而这种植入物与所给药（如口服或注射）的形式无关。所述植入物特别为 400 - 800 μm 大小的基质或包衣类型的球形微胶囊（图 8 - 9），因而它们比被体细胞内在化微粒要求的 0.5-10 μm 粒径要大得多。这些植入物从多聚氨基酸类（特别是 Leu/Glu）聚合物材料制成。这些植入物例如用聚氨基酸的二噁烷溶液进行成形，最后蒸去二噁烷。

在此现有技术状态下，本发明的基本目的之一是提供能够用作给人或动物体给药的活性成分（特别是药物和/或营养活性成分）输送载体的、基于多聚氨基酸的输送颗粒，特别是亚微米级和微米级输送颗粒，这些输送颗粒完全满足上文详述并重复如下的一系列要求：

1. 应该可能、最好能够得到平均直径在一到几微米级且粒径分布窄的输送颗粒，以便能使输送颗粒的粒度适于所选的给药方法和/或预期的治疗位点。例如，如果要经口服途径进行粘膜免疫，输送颗粒的粒度应在 0.5~10 μm ，以便输送颗粒能进入派伊尔结并达到淋巴组织。皮下给药时，具有粒度大于 10 μm 的输送颗粒有利，以便这种颗粒不再进入大循环，迅速被网状内皮系统内化，但从其注射位点逐渐扩散。

这一条件涉及输送颗粒的大小控制，既要控制输送颗粒的粒度分布还要控制其平均直径，这从工艺角度看是很复杂的操作。

2. 希望输送颗粒对活性成分提供的保护直到释放位点。例如，疫苗组成的活性成分口服给药时，疫苗在整个胃肠道中受到保护。

3. 构成输送颗粒的聚合物最好是生物相容性和可生物降解的，还希望它能被代谢为对身体无毒的物质。

4. 构成输送颗粒的聚合物最好不诱发免疫应答（不具有免疫原性）。

5. 最后，还希望能通过不使活性成分变性的方法获得输送颗粒，因此不能使用有机溶剂和/或高温。

本发明的另一基本目的是提供具有可控制并可调节的平均粒度的多聚氨基酸基输送颗粒，粒度在 200 μm (MDP) 到几纳米 (NDP) 范围内变化。

本发明的另一个基本目的是提供易于制备（非破坏性 pH）、在 4~13 的任何 pH 下稳定且为非免疫原性的输送颗粒。

本发明的另一基本目的是提供在工业上易行且经济能够以高负载度负载活性成分的基于多聚氨基酸的输送颗粒。

本发明的另一基本目的是提供能用作活性成分输送载体的多聚氨基酸基 MDP 和/或 NDP 的制备方法，所述方法具有耗资小、操作简单且对活性成分无致变性的优点，而且能精确控制所得颗粒的平均粒度（最大 200 μm ）。

本发明的另一基本目的是上述颗粒在制备药品（如疫苗）和/或营养品中的用途，特别是用于活性成分如蛋白、糖蛋白、肽、多糖、脂多糖、寡核苷酸和多核苷酸的口、鼻、阴道、眼、皮下、静脉内、肌内、皮内、腹

膜内、大脑内或肠胃外给药。

本发明的另一基本目的是提供一种含活性成分缓释系统的药品，它具有生物相容性且产生活性成分的高生物利用度。

本发明的另一基本目的是一种疫苗的输送系统，它是内在非免疫原性的，并与一种或多种抗原结合。

本发明特别涉及本发明获得的产物，即平均粒度小于 $200\mu\text{m}$ 的多聚氨基酸基活性成分输送颗粒，其特征：

在于其构成性多聚氨基酸含有至少两类重复氨基酸，AAN 和 AAI：

- ◆ AAN 型相当于疏水性中性氨基酸，
- ◆ AAI 型相当于带有可离子化侧链的氨基酸，AAI 型重复氨基酸的至少一部分为电离形式，

AAN 和 AAI 中每类重复氨基酸相互相同或不同，

— 还在于多聚氨基酸的重均摩尔质量 M_w 不低于 4000D，优选不低于 5000D。

申请人被认为已从多聚氨基酸进行了筛选，以致仅使用具有非水溶性、在宽 pH 范围内形成稳定的胶态悬液并与预期应用的生理介质 pH 值相兼容特性的那些，其含有由疏水的中性氨基酸组成的第一类 AAN 单体和至少一种由 AAI 氨基酸组成的第二类单体，AAI 氨基酸的特征是带羧基官能团的侧链（Glu, Asp），在生理 pH 下可离子化，并对蛋白是非致变性的。

本发明的特征之一是，这些多聚氨基酸（PAA）为线性，更优选它们具有 α - 肽键。

最好，选择作为本发明输送颗粒构成元件的 PAA 可以是“嵌段” PAA 和/或“统计学” PAA。“嵌段” PAA 是具有交替排列结构的那些，其中氨基酸沿聚合物链以嵌段分布。“统计学” PAA 是具有随机无序结构的那些，其中氨基酸随聚合物链以无规方式分布。

至于 AAN/AAI+AAN 摩尔比，它取决于 PAA 的“嵌段”或“统计学”结构。该摩尔比为：

- 一对“嵌段” PAA， $\geq 6\%$ ，优选 $\geq 15\%$ ，
- 一对“统计学” PAA， $\geq 20\%$ ，优选 $\geq 25\%$ 。

本发明的另一特征是所选多聚氨基酸的质量高。

对此应指出的是本发明所用多聚氨基酸的优选重均摩尔质量 (Mw) 根据所用聚氨基酸的类型而不同。

例如，对如上定义的“嵌段”多聚氨基酸， $Mw \geq 5500D$ ，优选 6500D - 200000D，更优选 8000 - 20000D。

而对“统计学”多聚氨基酸， $Mw \geq 10000D$ ，优选 20000D - 500000D，更优选 20000D - 150000D。

这些多聚氨基酸形成能够与疏水物质和亲水物质相作用的两性聚合物，这赋予它们以有价值的表面活性剂或分散剂的特性。但除其两性特征外，这些多聚氨基酸显示出出人意外的新特性：这些多聚氨基酸链在水溶液中自动结合并形成能与蛋白质结合的颗粒。实际上，这些颗粒最好形成活性成分分散于其中的基质。优选的 α - 肽键线性结构和高摩尔质量也是这些多聚氨基酸的重要特征。

这些非水溶性 PAA 显示出出人意外的新特性。当与水溶液接触时，它们在其中自动形成纳米颗粒 (NDP) 的胶态悬液，这些纳米输送颗粒能够聚集为微米颗粒。另外，溶液中的蛋白质能够与这些颗粒自动结合，形成载有活性成分的颗粒。

这一发现在考虑到专利申请 WO 93/25583 的教导时就更加令人惊异了，后者似鼓励本领域技术人员将其寻求蛋白包囊理想材料的研究朝向多聚氨基酸之外的物质。实际上，专利申请 WO 93/25583 中给出的已进行过的大量试验提示：在所有受试多聚氨基酸中，只有该申请所选择并要求的那些适用。申请人经过了创造性的劳动才证明事实并非如此，申请人提出了与 WO 93/25583 中那些聚氨基酸行为不同的另一类选择的聚氨基酸，这些 PAA 特别为：

高摩尔质量的线性 PAA (4000D 以上)，而不是小的支寡聚物，

—不溶性 PAA，而且令人惊异的是这些不溶性 PAA 自动形成 NDP 胶状悬液，蛋白质自发与 NDP 结合。

优选的聚氨基酸是最好由经肽键连接的 α —氨基酸组成的线性合成聚合物。有大量的合成技术可形成嵌段或统计学聚合物、含多条链的聚合物及含特定氨基酸序列的聚合物（见“聚合物科学和工程大全”（Encyclopedia of Polymer Science and Engineering），第 12 卷， 786 页； John Wiley & Sons）。为合成多聚氨基酸使用了大量氨基酸和肽衍生物。但最常用的单体是 N—羧基 α —氨基酸酐，后者的制备例如见《生物聚合物》（Biopolymers），15，1869（1976）。这些单体的聚合是本领域技术人员已知的，并在 H.R. KRICHELDORF 的著作“ α —氨基酸—N—羧基氨基酸酐及相关杂环” Springer Verlag (1987) 中有详细描述。

这种合成技术一般涉及对带可离子化侧链的氨基酸中的反应性官能团进行保护，以使其不参与聚合步骤。聚合后有必要进行脱保护步骤，以重建聚合物可离子化侧链的官能团。例如可提及甲酯皂化的脱保护方法〔STAHMAN 等，生物化学杂志（J.Biol. Chem.），197,771(1952); KYOWA HAKKO,FR 2152582〕或脱苄基化〔BLOUT 等，美国化学会杂志（J. Amer. Chem. Soc.），80, 4631 (1858)〕。

最好，输送颗粒的平均聚氨基酸浓度为 0.01%—25%（干重），优选 0.05-10%（干重）。

按本发明颗粒的一种优选实施方案，AAN 选自下列：即 Leu、Ile、Val、Ala、Pro、Phe 和其混合物，而 AAI 由 Glu 和/或 Asp 组成。

更优选，本发明的颗粒以其组成性多聚氨基酸含单一类型 AAI 单体为特征，优选相应于 Glu，而单一类型 AAN 单体优选相应于 Leu。

将共聚单体限制到两种，即一种 AAN 和一种 AAI，使得颗粒的免疫原性最小。这是这一优选实施方案的显著优点。

选择的聚氨基酸颗粒大小构成本发明的基本要素。最好，这些颗粒的平均粒度为 0.01-200 μm 间，而且粒度分布窄。

本发明的最大价值之一是非常成功地控制颗粒的平均粒度和其粒度分布。这种控制来自极小颗粒的获得，这种颗粒大小在几个纳米的级别并且

有很低的多分散性，已知这种纳米颗粒的大小可能经聚集而增大。虽无意对此施加任何限制，但根据其大小可能区分两个组群的颗粒。

第一个组群是纳米颗粒型 NDP 的集合，平均粒度在 $0.01\mu\text{m}$ 到 $0.5\mu\text{m}$ 之间，优选在 $0.03\text{-}0.4\mu\text{m}$ 间。

第二组群包括 MDP 型颗粒，平均粒度大于 $0.5\mu\text{m}$ ，优选不超过 $20\mu\text{m}$ 。

为本发明目的，平均粒度应理解为：对 MDP，为通过激光衍射测定的直径算术平均值（体积）（D4.3），对 NDP，为通过光的弹性散射测定的回转直径。

微米粒 MDP 最好从纳米粒 NDP 如通过聚集而获得。

一种变异方案中，微米粒包含至少一种聚集剂。

本发明的一个优选特征是，颗粒包含至少一种活性成分。

另外，通过聚氨基酸的组成、对相同组成还通过有序结构（交替序列，即嵌段： S_1 ）或无序结构（随机序列，即统计的： S_2 ）来达到 MDP 和 NDP 粒度的控制。

本说明书中将使用的聚氨基酸的命名方法如下：聚 AAN1/AAN2/…/AAI1/AAI2/…-A/B/C/D …，A、B、C、D …为氨基酸的摩尔百分率。另外，加上述语“嵌段”来区别有序嵌段结构和无序或统计结构。例如，由 30 % 亮氨酸和 70 % 谷氨酸组成的统计共聚物为聚 Leu/Glu-30/70，具有相同组成和嵌段结构 ($\text{Leu})_n\text{-(Glu)}_m$ 的共聚物为聚 Leu/Glu (嵌段) - 30/70。

根据本发明的一个优选实施方案，该颗粒的特征在于 $\text{AAI} = \text{Glu}$ ，
 $\text{AAN} = \text{Leu}$ 。

除本身为新物质的上述颗粒外，本发明还涉及能用作活性成分输送载体的聚氨基酸基颗粒的制备方法，其特征：

— 在于使用聚氨基酸（PAA）：

◆ 含有至少两类重复氨基酸，AAN 和 AAI：

· AAN 型相当于疏水中性氨基酸，

· AAI 型相当于具有可离子化侧链的氨基酸，

AAN 和 AAI 中每类重复氨基酸相互相同或不同，

◆ AAN/AAI+AAN 摩尔比 $\geq 3\%$ ，优选 $\geq 5\%$ ，

- ◆聚氨基酸的重均摩尔质量不低于 4000D，优选不低于 5000D，
 - 还在于这些聚氨基酸在液体、优选在盐水溶液中进行分散，液体 pH 调节在一个选定的值，此时至少部分 AAI 型氨基酸为电离形式，
 - 还在于收集颗粒的胶体溶液。

以上在介绍颗粒的部分给出的 PAA 特征的描述可以整个转至这里关于方法的描述部分。

该方法是获得上述 NDP 的方法之一。因而这些颗粒是其中 AAN 选自下列：即 Leu 、 Ile 、 Val 、 Ala 、 Pro 、 Phe 和其混合物的那些，和其中 AAI 由 Glu 和/或 Asp 组成的那些。

NDP 的形成方式很简单，在盐水溶液（例如）中，在使至少部分 AAI 单体（相互间性质相同或不同）呈离子化形式的选定 pH 下，共聚氨基酸在盐水介质中分散自动形成纳米粒，这使其具有值得注意的简单、经济和工业上易行的特点。

另外，利用该方法可能避开有机溶剂，后者一般用于此类颗粒的制备且已知造成蛋白变性。

获得这些 NDP 的条件易于被本领域技术人员掌握。

NDP 的形成一方面依赖于水分散溶液的性质，另一方面依赖于聚氨基酸的特征。

用于聚氨基酸分散的水溶液必须满足 pH 和离子强度的一定条件。实际上很容易理解，含离子化基团的聚合物纳米粒的稳定性取决于离子强度。至于 pH，它当然取决于可离子化基团的性质，根据它确定电离份数 f 。例如，对于羧基， f 随着 pH 升高而增大。

总之，本发明方法最明确的优点是允许在 3 – 13 的宽 pH 范围内不依赖于 pH 而自动形成 NDP，从而充分覆盖了生物 pH 值范围，开辟了广阔的应用领域。

聚合氨基酸的 NDP 形成胶体溶液。

就这些聚氨基酸，NDP 形成的区别性特征是：

- 1) 摩尔质量，
- 2i) 氨基酸的性质，

- 3i) 氨基酸的比例,
- 4i) 存在线性连接, 优选 α - 肽连接,
- 5i) 沿聚合物链的氨基酸分布, 根据“嵌段”或“统计”结构, 分别为规则或随机分布。

这些特征讨论如下:

关于摩尔质量的影响, 可注意到 NDP 形成是由聚氨基酸链间氨基酸的结合, 这种结合行为根据聚合物的结构和摩尔质量而不同。

对“统计”结构的聚氨基酸, 摩尔质量不低于 10000D, 优选在 20000D - 500000D 间, 更优选在 20000D - 150000D 间的聚合物, 易于分散在水溶液中并形成稳定的 NDP 胶态悬液。在相同条件下, 较低摩尔质量的聚合物不能形成稳定的胶态悬液; 部分颗粒沉淀, NDP 保持在分散液中, 扩散倾向很小。因而, 较高摩尔质量的聚氨基酸更有利于聚合物链结合成 NDP。

对于“嵌段”结构的聚氨基酸, 有利于相同氨基酸嵌段间的链间结合, 从而允许使用比“统计”结构聚氨基酸摩尔质量小的聚合物。摩尔质量不低于 5000D, 优选 6500 - 20000D, 更优选 8000D - 20000D 的聚合物易于分散在水溶液中, 形成稳定的 NDP 胶态悬液。

关于氨基酸性质和其比例的影响, 可指出: 对于亮氨酸和谷氨酸的 PAA, 亮氨酸的份数必须足够高以防止聚合物完全可溶, 并提供使聚合物链结合成 NDP 的足够疏水作用。“嵌段”聚氨基酸对这种链间作用有利, “嵌段”聚合物形成 NDP 所需最小亮氨酸份数低于“统计”聚合物所需的。例如, 已可能证明亮氨酸和谷氨酸“统计”聚合物中的临界浓度(低于此浓度则聚合物可溶)为 20 - 30 %。

为制备本发明的 NDP, 最好将盐水溶液的摩尔浓度设在 10^{-4} - 1M, 优选 10^{-2} M 到最高 0.5M。

本发明的另一实用细节是, 选择溶液中聚合物浓度(用重量/体积百分数表示)不低于 10^{-2} , 优选 0.05-30, 更优选 0.05 - 5。

因为本发明颗粒和其制备方法的最令人注目的应用之一是保护下在人或动物体内输送活性成分, 为此目的, 最好设计使至少一种活性成分溶解在形成颗粒的液态介质中。

活性成分的溶解，尤其对于蛋白性和肽活性成分，优选在向介质引入聚氨基酸之前进行，以在引入后得到载有活性成分的颗粒的胶态溶液。

虽不希望拘于理论，但可以假定活性成分与聚氨基酸之间的作用是疏水结合和静电结合的结果。

综上所述，本发明的包囊构成如下：

- 使活性成分包囊到水溶液中，
- 将聚氨基酸分散在水溶液中，然后将所形成的纳米粒的胶态悬液与活性成分溶液混合，或者优选地将聚氨基酸直接分散在活性成分溶液中，以自动得到载有活性成分的纳米粒。

本发明的主要基本特征之一是活性成分与颗粒的结合行为不依赖于 pH。

从上文已看到，将共聚氨基酸分散在液态介质（优选盐水）中，构成本发明适当载有活性成分之颗粒制备方法的一个关键步骤。本发明方法的特征还在于它还包括至少一个将纳米粒（NDP）聚集成微米粒（MDP）的步骤，优选借助于盐和/或酸和/或聚合物（最好用聚电解质）。

由于本发明方法的这一特征，可以将 0.01-0.05 μm 大小的 NDP 聚集成 0.05-200 μm 大小的 MDP，优选 0.05-20 μm ，更理想为 0.05-10 μm 大小。

这种聚集必须在对活性成分非致变性的条件下进行，申请人发现加入盐或酸或阳离子聚合物尤其能造成 NDP 聚集成 MDP。

加入盐使介质离子强度升高，掩蔽颗粒间的静电排斥而造成 NDP 聚集。另外，该盐还可作为颗粒表面聚氨基酸羧基官能团的交联剂，几个羧酸与盐的阳离子配合从而造成聚集。此时优先选择那些与羧酸形成配合物的多阳离子盐，如 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{2+} 、 Al^{3+} 和 Cu^{2+} 盐。

加入酸则中和聚氨基酸的羧基官能团从而降低电离份数 f ，造成 NDP 聚合成 MDP。能发生聚集的电离份数取决于聚氨基酸的组成 $\text{AAN}/(\text{AAN}+\text{AAI})$ 。AAI 比例越高，该份数越小。加入的酸最好是 pKa 低于聚氨基酸羧基官能团的强酸。

阳离子聚合物通过结合 NDP 而作为聚集剂，它们在颗粒表面的羧酸官能团之间形成配合物，从而通过阳离子聚合物分子将其相互连接。

NDP 聚集成 MDP 的条件在实施例给出。

本方法最后是按本身已知的适当方法回收有或无活性成分包裹的（纳米）和（微米）颗粒。实践中，例如可使用离心和冷冻干燥。

能包含或引入（优选按一基质型设置）本发明颗粒（无论是否按上述方法获得）中的活性成分，是药物和/或营养物。优选选自：

◆蛋白和/或肽，其中优选选自：血红蛋白，细胞色素，白蛋白，干扰素，抗原，抗体，calatomin，促红细胞生成素，胰岛素，生长激素，第IX因子，白细胞介素或其混合物，

◆多糖，尤其选择肝素，

◆核酸，优选 RNA 和/或 DNA 的寡核苷酸，

◆和它们的混合物。

一种可归入药品类适于用本发明颗粒输送的活性成分是疫苗。

作为营养物的例子可提及维生素、氨基酸和微量元素。

本发明的另一个方面还涉及载有活性成分的 NDP 和 MDP 在制备含活性成分控释系统的药品中的用途。

最后，本发明涉及含有如上所定义载有活性成分的输送颗粒的药品或药物制剂或营养制剂。

对于药品，它们例如可以是优选经口、鼻、阴道、眼、皮下、静脉内、肌内、真皮内、腹膜内、大脑内或肠胃外途径给药的那些。

本发明的应用不限于药物或营养物类活性成分的输送或转远。实际上，能包含在或引入输送颗粒的活性成分为至少一种化妆产品或植物保护剂是完全可以想像的。可以设想化妆品应用为例如可透皮施用的组合物。所述植物保护剂例如可为除草剂、杀虫剂、杀昆虫剂、杀真菌剂等。本发明的主题还包括含如上指出的载有活性成分的输送颗粒的植物保护组合物和化妆品组合物。

下列实施例将使人从其产品/方法/应用的不同方面更好地理解本发明。这些实施例说明载有或以其他方式带有活性成分的聚氨基酸颗粒的制备，还给出了这些颗粒的结构特征和特性。

实施例

I. 所测试聚氨基酸的制备

实施例中所用聚合物具有嵌段或统计结构的基于亮氨酸和谷氨酸的线性合成共聚物。这些聚氨基酸通过在三氟乙酸溶剂中用光弹性散射测定，重均摩尔质量 M_w 为 50000D 到 150000D。

这些聚合物从亮氨酸和谷氨酸甲酯的共聚物获得，用例如 STAHMAN 等，“生物化学杂志”，197, 771 (1952) 或 KYOWA HAKKO 专利 FR 2152582 中所述已知的甲酯脱保护方法，重建谷氨酸钠的可离子化侧链官能团。

亮氨酸和谷氨酸甲酯的共聚物从亮氨酸和谷氨酸甲酯的 N - 羧基 - α - 氨基酸酐 (NCA) 获得，后者的制备方法例如见“生物聚合物”，15, 1869 (1970)。NCA 聚合成具有嵌段或统计结构的聚合物所用的技术是本领域技术人员已知的，并在 H.R. KRICHELDORF 的著作“ α - 氨基酸 N - 羧基酸酐及相关杂环” (Springer Verlag, 1987) 中有详细描述。

实施例 1：“统计”聚氨基酸聚 (Leu/Glu) 50/50 的合成

步骤 1): NCA - Leu 和 NCA - Glu (OMe) 的共聚化：

聚 (Leu-CO-Glu(OMe))50/50 :

向一装有玻璃搅拌器、氮气入口和出口并与一鼓泡装置相接的 1 升反应器中，在氮气流下加入 15.0g 谷氨酸甲酯 N - 羧基酸酐 (NCA - Glu(OMe), 0.08mol) 和 12.5g 亮氨酸 N - 羧基酸酐 (NCA - Leu, 0.08mol)。加入 381ml 二𫫇烷，加热反应介质至 40 °C。

NCA 溶解后，加入 24ml 水，然后加入 0.22ml 三乙胺 (相对 NCA, 相当于 1mol%)。在 IR 中观察 1860 和 1790cm^{-1} 处羧基键的消失来监视聚合过程。根据单体的组成聚合时间在 1.5 小时到 3 小时。两个带完全消失以后，用 380ml 二𫫇烷稀释反应介质，然后在室温下均质化 3 小时。在 5 升水中充分搅拌下沉淀以回收共聚物。过滤产物并在 55 °C 下真空干燥 12 小时。

共聚物重 18.4g，相当于 90 % 的重量收率。 $^1\text{HNMR}$ (三氟乙酸-d) :

0.85 ppm (CH₃-Leu, 6H*0.5); 1.58 (CH₂ 和 CHMe₂-Leu, 3H*0.5); 2.10 和 2.22 (CH₂-Glu, 2H*0.5), 2.58 (CH₂-Glu, 2H*0.5).

3.75 (CH₃-Glu, 3H*0.5); 4.62 (NCHCO-Leu, 1H*0.5), 4.70 (NCHCO-Glu, 1H*0.5)。
比浓粘度 (三氟乙酸中 0.5g/dl, 25 °C) = 2.2dl/g。

步骤 2): 聚 (Leu-CO-Glu(OMe) 50/50 的甲酯水解

将上述所得共聚物(17.7g)置于一反应器中, 向其中加入 354ml 三氟乙酸。搅拌下加热反应介质至 40 °C。当共聚物完全溶解时, 每次少量加入 354ml 水。反应介质保持搅拌 48 小时。

在 5 升水中沉淀来回收共聚物。过滤后再次悬浮于水中并搅拌 0.5 小时, 然后过滤, 排水。对水透析进行纯化。

收率: 15.9g (95%)。¹H NMR (三氟乙酸-d) : 与起始共聚物相同, 只是 3.75 处的单峰 (CH₃ - Glu) 大大降低或消失。本例中相对谷氨酸酯单体, 残余酯含量小于 1 %。比浓粘度 (三氟乙酸中 0.5g/dl, 25 °C) = 0.95dl/g。

实施例 2: “嵌段”聚氨基酸聚 (Leu/Glu) 50/50 二嵌段共聚物的合成

将 15.0g NCA-Glu(OMe) (0.08mol) 和 180mol 二噁烷在搅拌下引入 1 升反应器中。溶解后, 加入 180ml 甲苯, 加热混合物至 60 °C。记录溶液的 IR 光谱, 然后加入 0.156g 苄胺(1.58mol%/NCA)。反应介质迅速变混浊, 40 分钟后 1860 和 1790cm⁻¹ 处的特征峰消失。

1 小时后, 加入 12.5g NCA-Leu (0.08mol) 在二噁烷/甲苯混合物 (各 15ml) 中的溶液。继续搅拌 18 小时 (这是最优化时间)。羧基带已消失。加入 100ml 二噁烷, 将反应介质均质化 1 小时。在 3 升绝对乙醇中剧烈搅拌下共聚物沉淀出来。用 1 升乙醇洗涤, 过滤, 排水, 最后 50 °C 下干燥过夜。

所得产物重 19.5g (收率 = 95 %)。¹HNMR (三氟乙酸-d) :
0.85 ppm (CH₃-Leu, 6H*0.5); 1.58 (CH₂ 和 CHMe₂ Leu, 3H*0.5), 2.10 和 2.22 (CH₂-Glu, 2H*0.5); 2.58(CH₂-Glu, 2H*0.5); 3.75 (CH₃-Glu, 3H*0.5); 4.62 (NCHCO-Leu, 1H*0.5); 4.70 (NCHCO-Glu, 1H*0.5)

比浓粘度 (三氟乙酸中 0.5g/dl, 25 °C) = 0.62dl/g。

第二步甲酯的水解与实施例 1 步骤 2 中描述的相同。收率 = 95 %,

¹HNMR (三氟乙酸)：与起始聚合物相同，但是 3.75 的单峰 (CH₃ - Glu) 大大降低或消失。在本例中，残余酯含量相对谷氨酸酯单体小于 1%。25 °C 下的还原粘度 (三氟乙酸中 0.5g/dl) = 0.55dl/g。

实施例 3：“嵌段”聚氨基酸聚 (Glu/Leu/Glu) 29/57/14 三嵌段共聚物的合成

将 7.5g NCA-Glu(OMe) (0.04mol) 和 180ml 二𫫇烷搅拌下加入 1 升反应器中。溶解后，加入 180ml 甲苯，加热混合物至 60 °C。记录溶液的 IR 光谱，然后加入 0.156g 芳胺。

单体完全消后，加入二𫫇烷/甲苯混合物 (各 15ml) 中的 12.5g NCA-Leu (0.08ml)。继续搅拌 18 小时。然后再加入 7.5g NCA-Glu (OMe) (0.04mol)，让反应进行 12 小时。加入 100ml 二𫫇烷，均化反应介质 1 小时。

该共聚物在 3 升绝对乙醇中剧烈搅拌下沉淀。用 1 升乙醇洗涤，过滤，排水，最后在 50 °C 真空干燥过夜。

所得产物重为 19.4g (收率 = 95%)。¹HNMR (三氟乙酸)：

0.85 ppm (CH₃-Leu, 6H*0.5), 1.58 (CH₂ 和 CHMe₂ Leu, 3H*0.5); 2.10 和 2.22 (CH₂-Glu, 2H*0.37), 2.58 (CH₂-Glu, 2H*0.37); 3.75 (CH₃-Glu, 3H*0.37); 4.62 (NCHCO-Leu, 1H*0.5); 4.70 (NCHCO-Glu, 1H*0.37)。

比浓粘度 (三氟乙酸中 0.5g/dl, 25 °C) = 0.58dl/g。

第二步甲酯水解与实施例 1 步骤 2 所述相同。¹HNMR(三氟乙酸-d)：与起始聚合物相同，只是 3.75 处的信号 (CH₃ - Glu) 大大降低或消失。在本例中，残余酯的含量相对谷氨酸酯单体小于 1%。比浓粘度 (三氟乙酸中 0.5g/dl, 25 °C) = 0.38dl/g。

II. 含或不含活性成分的聚氨基酸纳米粒 (NDP) 的形成

II-1. AAN 浓度对颗粒形成的影响

实施例 4：形成具有“统计”结构的聚 (Leu/Glu) 30/70, 50/50 和 75/25 的纳米粒。

组成为 Leu/Glu=30/70、摩尔质量 Mw=36000D 的亮氨酸和谷氨酸钠的统计共聚氨基酸 100mg，分散在摩尔浓度为 10⁻²mol/l 的氯化钠溶液

100ml 中。加入盐酸或氢氧化钠可调节 pH，在 4.5-12 间的任何溶液 pH 下，该聚合物自动形成纳米粒胶态分散体。在低于 pH4.5 的酸性介质中（这相当于电离份数等于 0.05），冷冻干燥的聚合物不能分散在该溶液中，保持不溶。

在相同分散条件下试验了组成为 $\text{Leu}/\text{Glu} = 50/50$ 及 $75/25$ 、摩尔质量 M_w 分别为 60000D 和 34000D 的亮氨酸和谷氨酸钠统计共聚氨基酸，观察结果整理在下表 1 中。

表 1

聚氨基酸	存在纳米粒的 pH 范围	谷氨酸的电离份数 f
聚(Leu/Glu) 30/70	[4.5-12]	>0.05
聚(Leu/Glu) 50/50	[4.7-12]	>0.05
聚(Leu/Glu) 75/25	[6.2-12]	>0.30

实施例 5：形成具有“嵌段”结构的聚 (Leu/Glu) 20/80 40/60 和 50/50 的纳米粒

组成为 $\text{Leu}/\text{Glu} = 50/50$ 、摩尔质量 $M_w=14600$ 的亮氨酸和谷氨酸钠的嵌段共聚氨基酸 100mg，分散在摩尔浓度为 10^{-2} mol/l 的氯化钠溶液 100ml 中。加入盐酸或氢氧化钠可调节 pH，在 3 – 12 间的任何溶液 pH 下，该聚合物自动形成纳米粒胶态分散体，这些颗粒散射光并使溶液高度混浊。该溶液在 15 – 20 ℃ 室温下静置几小时，聚合物的纳米粒不沉淀。在低于 pH3 的酸性介质中，该聚合物不分散在溶液中，保持不溶。

在 pH3-12 的相同条件下，具有“嵌段”结构，摩尔质量分别为 11000D 和 15000D 的聚 (Leu/Glu) 20/80 和 40/60 分散并形成胶态悬浮液。聚合物中亮氨酸比例越高，这些胶态悬浮液散射光越强。在低于 3 的 pH 下，与聚 (Leu/Glu) 50/50 一样，观察到这些聚合物不分散，保持不溶。

实施例 6：具有“统计”结构的聚 (Leu/Glu) 18/82 的溶解度

该实施例表明，组成为 $\text{Leu}/\text{Glu}=18/82$ 的亮氨酸和谷氨酸钠共聚物不能形成纳米粒，因为无论 $\text{pH} \leq 4.5$ ，它们完全溶于水。

将 10mg 冻干的聚 (Leu/Glu) 18/82 分散在摩尔浓度为 10^{-2} mol/l 的氯化钠溶液 0.5ml 中。该聚合物完全溶解，溶液清澈。

该聚合物不能形成纳米粒。

实施例 7：不同聚 (Leu/Glu) 聚合物胶态悬液的稳定性

将组成为 Leu/Glu=30/70 、 50/50 和 75/25 、摩尔质量 Mw=36000D 、 60000D 和 34000D 的亮氨酸谷氨酸钠统计共聚氨基酸 100mg 分别分散在 10ml 、 5ml 和 2ml 10^{-2} mol/l 氢氧化钠溶液中，从而形成浓度为 1% 、 2% 和 5% w/v 的各种聚氨基酸的溶液。然后在室温 (15 - 25 °C) 下放置 4 个月测定其稳定性。测试期结束时纳米粒没有沉淀出来，溶液的扩散系数没有变化。

实施例 8：具有“统计”结构和具有“嵌段”结构的聚 (Leu/Glu) 50/50 在等渗磷酸盐缓冲液中形成纳米粒

将具有“统计”结构，摩尔质量 Mw 等于 60000D 的聚 (Leu/Glu) 50/50 聚氨基酸 100mg 分散在含有 0.01mol/l 磷酸盐缓冲液、 0.138mol/l 氯化钠和 0.0027 mol/l 氯化钾的 pH7.4 等渗溶液 (PBS ，见 SIGMA 分类号 P4417) 中。该聚合物自动形成纳米粒的胶态分散液，其散射光线。该溶液在 15 - 20 °C 的室温下放置数小时，聚合物的纳米粒没有沉淀。

在相同条件下，当将 100mg 摩尔质量 Mw=14600D 的聚 (Leu/Glu) 50/50 嵌段聚氨基酸分散在 PBS 缓冲液中时，获得纳米粒悬液，其在室温下稳定，以高浓度散射光线。

II.2 - “统计”结构或“嵌段”结构聚 (Leu/Glu) 纳米粒的大小和结构

聚氨基酸的纳米粒形成胶态溶液。静态或准弹性光散射使得能测定纳米粒的大小和聚合物密度。

表 2 中综合了对组成为 Leu/Glu=30/70 和 50/50 、摩尔质量 Mw 为 46000D - 21000D 的统计聚氨基酸、以及组成为 Leu/Glu 20/80 和 50/50 、摩尔质量为 11000D - 16300D 的“嵌段”聚氨基酸进行测定的结果。为了进行这些测定，将聚氨基酸分散在含 0.01mol/l 磷酸盐缓冲液、 0.138mol/l 氯化钠和 0.0027 mol/l 氯化钾的 pH7.4 等渗溶液中 (见 SIGMA 分类号

P4417)。

表 2

聚氨基酸	聚氨基酸的 摩尔质量	颗粒的几何半径 (nm)	颗粒中聚合物的重 量百分比(w/v)
聚(Leu/Glu)30/70	43000D	70	1.2
聚(Leu/Glu)30/70	23000D	58	1.0
聚(Leu/Glu)50/50	46000D	73	2.6
聚(Leu/Glu)50/50	21000D	55	4.3
聚(Leu/Glu)50/50 嵌段	14600D	140	3.6
聚(Leu/Glu)50/50 嵌段	16300D	120	5.5
聚(Leu/Glu)28/80 嵌段	11000D	59	5.4

纳米粒的大小随着聚氨基酸的组成而变化。对于相同的组成，则取决于聚氨基酸链的二嵌段或无序结构。

另外，基于准弹性光散射分析，聚氨基酸纳米粒的直径分布为正态分布，集中在其平均值周围。所得分布宽度与多分散性为 1.2 的聚苯乙烯的相当或较小。纳米粒中聚合物浓度很低，总低于 6 % w/v。这取决于聚氨基酸的组成和二嵌段或无序结构。

而且，电子显微镜观察 (TEM 负染) 显示纳米粒为球形或略偏长。

II.3-纳米粒的免疫原性

实施例 9：聚 (Leu/Glu) 40/60、50/50 和 60/40 (嵌段) 纳米粒的致免疫能力

将摩尔质量等于约 12000D 的聚 (Leu/Glu) 40/60、50/50 和 60/40 (嵌段) 分散在含有 0.01 mol/l 磷酸盐缓冲液、0.138 mol/l 氯化钠和 0.0027 mol/l 氯化钾的 pH7.4 等渗溶液 (见 SIGMA 分类号 P4417) 中。聚合物浓度等于 2.5 mg/ml。该悬液浑浊，将其通过 0.2 μm 孔径的聚砜膜过滤以灭菌没有特别困难。所用动物为无血亲 OF1 种系小鼠 (每种试验聚合物用 5 只小鼠为一组)。

每次注射皮下注射 100 μl 聚合物悬液 (250 μg 聚合物)。在 D0 时间进

行第一次注射，在 D35 时间进行加强注射。在 D42 时间取样，即在第二次注射后第 7 天。将血样在室温放 24 小时，然后 3000rpm 离心 10 分钟。

用 ELISA 实验分析血清。在血清中，包括低血清稀释液 (1/10) 中，没有检测到抗聚合物的抗体。

该实施例显示聚 (Leu/Glu) 40/60、50/50 和 60/40 (嵌段) 的纳米粒不能诱导特异的免疫应答。

II.4 – 纳米粒与有色模型蛋白的结合

用血红蛋白和马心及酿酒酵母的细胞色素 c 作为模型蛋白描述包囊方法。

用分析型超速离心法证明聚合物纳米粒与蛋白之间的结合。高速离心聚合物和蛋白的溶液，在 250nm 和 410nm 波长处测定光密度来监视聚合物和蛋白的沉降前峰的进展。

蛋白与胶体颗粒的结合以存在单一沉降前峰为特征，该单一前峰相当于在两波长下沉降前峰的重叠。反之，若没有结合，蛋白和胶体颗粒的沉降前峰是分开的，没有重叠。

实施例 10：聚 (Leu/Glu) 30/70 与细胞色素 c 的结合

将 10mg 细胞色素 C 溶解在 100ml pH7.2 摩尔浓度 0.01 mol/l 的磷酸钠缓冲溶液中。然后将 100mg 摩尔质量 Mw=36000D 的聚 (Leu/Glu) 30/70 直接分散在该溶液中。离心过程中，大部分细胞色素 c 与聚合物的胶体颗粒沉积。沉降前峰的光密度分析表明 80 % 的细胞色素与胶体颗粒结合。

实施例 11：聚 (Leu/Glu) 30/70 与细胞色素 c 的结合

将 10mg 细胞色素 c 溶解在 100ml pH7.2 摩尔浓度 0.01 mol/l 的磷酸钠缓冲溶液中。然后将 200mg 摩尔质量 Mw=60000D 的聚 (Leu/Glu) 50/50 直接分散在该溶液中。离心过程中，大部分细胞色素 c 与聚合物的胶体颗粒沉积。沉降前峰的光密度分析表明 80 % 的细胞色素与胶体颗粒结合。

实施例 12：聚 (Leu/Glu) 30/70 与血红蛋白结合

在本实施例中，按两种不同的方式从实施例 4 中的相同溶液制备聚氨基酸和蛋白的胶体悬液，但溶解顺序有变：

1. 按实施例 4 中的相同条件下将摩尔质量 $M_w=90000D$ 的聚 (Leu/Glu) 30/70 分散在血红蛋白溶液中。胶体悬液的超速离心分析表明血红蛋白与纳米粒中的聚氨基酸结合。

2. 将摩尔质量 $M_w=40000D$ 的聚 (Leu/Glu) 30/70 分散在不含血红蛋白的缓冲溶液中。然后所形成的胶体悬液与血红蛋白溶液混合。这种情况下, 大部分血红蛋白 (估计 80 %) 不与聚氨基酸的纳米粒结合, 超速离心分析显示两个分别相应于聚合物纳米粒和血红蛋白的沉降前峰。

聚氨基酸分散前蛋白溶解的第一步对于血红蛋白来说提供了更好的包裹收率。

II.5 – 纳米粒与蛋白的结合

实施例 13：卵清蛋白存在下聚 (Leu/Glu) 30/70 的结合

在实施例 4 或 5 的相同条件下, 将摩尔质量 $M_w=90000D$ 的聚 (Leu/Glu) 30/70 分散在另外含有卵清蛋白的氯化钠溶液中。光散射分析的胶体颗粒特征与无蛋白时所形成颗粒的相同。因而, 蛋白并不阻止聚氨基酸结合成为纳米粒, 当蛋白质相对聚氨基酸的浓度达 20 % w/v 时仍如此。

实施例 14：聚 (Leu/Glu) 50/50 (嵌段) 与胰岛素的结合

从含有 0.01 mol/l 磷酸盐缓冲液、0.138 mol/l 氯化钠和 0.0027 mol/l 氯化钾的 pH7.4 的等渗溶液制备 1mg/ml 浓度的重组胰岛素 (SIGMA, 编号 10259) 溶液。将 50mg 摩尔质量为 12400D 的聚 (Leu/Glu) 50/50 (嵌段) 分散在 5ml 该胰岛素溶液中。得到了一种非常混浊但稳定的悬液。通过阈值为 300000D 的膜 (Millipore, Ultrafree-CL, filter) 超滤, 将溶液中的游离胰岛素与跟纳米粒结合的胰岛素分离, 并用 HPLC 色谱分析滤液中的游离胰岛素。这样, 用与游离胰岛素量之差测得与纳米粒结合的胰岛素量为 0.65mg/ml。

实施例 15：具有“统计”结构的聚 (Leu/Glu) 50/50 与胰岛素的结合

在与实施例 14 中相同的条件下操作, 用“统计”结构的聚 (Leu/Glu) 50/50 代替聚 (Leu/Glu) 50/50 (嵌段)。与纳米粒结合的胰岛素量为 0.60

mg/ml。

III. 纳米粒的聚集

III.1 - 加盐聚集

实施例 16：加硫酸铵聚集

将 100mg 摩尔质量 $M_w=36000D$ 的聚 (Leu/Glu) 30/70 分散在 pH5 的 0.05 mol/l 柠檬酸/磷酸钠缓冲液中。向此分散液中慢慢加入浓硫酸铵溶液。加入体积比分散溶液体积足够小，直到 NDP 聚集为 MDP。这样得到的 MDP 平均直径等于 $8\mu\text{m}$ 。

III.2 - 降低 pH 而聚集

纳米粒中聚氨基酸的侧链羧基官能团是部分电离的。加入酸将其中和引起纳米粒的聚集。

用解离常数 (活性成分) 小于聚氨基酸侧链羧基官能团的酸可进行这种聚集。

实施例 17：加盐酸聚集

将摩尔质量 M_w 分别等于 36000D、60000D 和 34000D 的组成为 Leu/Glu=30/70、50/50 和 75/25 的统计聚氨基酸分散在摩尔浓度为 0.05 mol/l pH 等于 5 的柠檬酸/磷酸钠缓冲液中。Leu/Glu 30/70 和 50/50 组成的聚氨基酸的浓度为 0.01% w/v, Leu/Glu 75/25 组成的聚氨基酸浓度为 0.005 w/v。

逐渐加入 0.1 mol/l 盐酸溶液进行胶体悬液中纳米粒的聚集，直到 NDP 聚集为 MDP。MDP 大小的测定结果列于下表 3 中。

表 3

聚氨基酸	平均直径(μm)	分布
聚(Leu/Glu) 30/70	$20\mu\text{m}$	$[2;100]\mu\text{m}$
聚(Leu/Glu) 50/50	$6\mu\text{m}$	$[2;15]\mu\text{m}$
聚(Leu/Glu)75/25	$3\mu\text{m}$	$[0.5;8]\mu\text{m}$

III.3 - 与阳离子聚合物配合而聚集

实施例 18：聚 (Leu/Glu) 50/50 的纳米粒通过与聚 - DL - 赖氨酸配合而聚集

纳米粒中聚氨基酸的侧链羧基官能团是部分电离的。它们与诸如聚赖氨酸的阳离子聚合物配合，引起纳米粒的聚集。

将 10mg 摩尔质量 $M_w=60000D$ 的聚 (Leu/Glu) 50/50 分散在 100ml 摩尔浓度为 0.01 mol/l 、 pH 等于 6 的磷酸钠缓冲液中。加入 15mg 摩尔质量 $M_w=15000D$ 的聚 - DL - 赖氨酸氢溴酸盐，能使聚合物的纳米粒聚集为微米粒。这种微米粒的平均直径为 10 到 20 μm 之间，随着加入盐酸或氢氧化钠调节的 pH 在 2 - 9 间的变化而变化。

III.4 - 通过纳米粒的聚集进行蛋白包囊

实施例 19：通过与聚 - DL - 赖氨酸配合进行细胞色素 c 的包囊。

将 10mg 摩尔质量 $M_w=60000D$ 的聚 (Leu/Glu) 50/50 分散在 100ml 摩尔浓度为 0.01mol/l 、 pH 等于 6 、含有 10mg 马心细胞色素 c 的磷酸盐缓冲溶液中。加入 15mg 摩尔质量 $M_w=15000D$ 的聚 - DL - 赖氨酸氢溴酸盐，能使聚合物的纳米粒聚集为微米粒。离心沉降微米粒；离心沉淀的红色表明基本上所有细胞色素已与纳米粒沉积，表明细胞色素被包囊在微米粒中。